

ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR EIGENSCHAFT EINER
ELEKTROGENEN IONENPUMPE
IN DER MEMBRAN GLATTER MUSKELZELLEN
DER TAENIA COLI DES MEERSCHWEINCHENS

Dieter Harms

1970

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

(Vorstände: Prof. ten Bruggencate,

Prof. Gerlach, Prof. Thureau)

ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGENSCHAFT
EINER ELEKTROGENEN IONENPUMPE IN DER MEMBRAN GLATTER
MUSKELZELLEN DER TAENIA COLI DES MEERSCHWEINCHENS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Dieter Harms

aus

Puchheim

Jahr

1978

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität

München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ulbrecht

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.I.1978



Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Methodik

III. Meinen Eltern und

a) der meiner Frau Irmingard

b) in Dankbarkeit gewidmet

c) der Hauptstadtvielfalt der Stadt Hamburg-Harburg der Provinz 1911 in Gegenwart der Stadt

d) der Hauptstadtvielfalt der Stadt Hamburg-Harburg der Provinz 1911 in Gegenwart der Stadt

IV. Diskussion

V. Literaturverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Methodik

III. Ergebnisse

- a) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli*
- b) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli* in Gegenwart von Ouabain
- c) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli* in Gegenwart von Desoxycorticosteron

IV. Diskussion

V. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Ionenverteilung und Ionenbewegungen an Membranen erregbarer Zellen bestimmen das Membranpotential und dessen Änderung.

HODGKIN und KEYNES (1955) haben am Riesenaxon des Tintenfisches die Ionenleitfähigkeit und deren Änderung untersucht. Zum Membranpotential tragen sowohl die selektive Ionen-Permeabilität als auch der aktive Transport von K^+ und Na^+ gegen ihren jeweiligen Konzentrationsgradienten bei. Der jeweilige Anteil jeder dieser beiden Prozesse am bestehenden Membranpotential bei den verschiedenen Membranarten ist unterschiedlich. Der durch den aktiven Ionentransport erzielte Anteil ist abhängig von den Größen, die den Netto-Ionentransport bestimmen.

Na -Efflux und K -Influx haben am Riesenaxon einen Q_{10} von ca. 3. Dagegen ist das Membranpotential des Riesenaxon nur geringfügig von der Temperatur abhängig. Die am Riesenaxon nachgewiesene Ionenpumpe muß infolgedessen im untersuchten Temperaturbereich elektroneutral funktionieren.

MULLINS und AWAD (1964) reicherten Frosch-Sartoriusmuskeln in der Kälte in Kalium-freier $Na-SO_4$ -Ringer-Lösung mit Natrium an, dem eine angemessene Menge Na^{24} beigelegt war.

Wenn solche Na^{24} -reichen Muskeln in eine Lithiumsulfat-Ringer-Lösung von 20°C gebracht wurden, erreichte der ansteigende Na-Efflux 15 Minuten nach dem Badwechsel seinen Maximalwert. Das Membranpotential in Kalium-freier Na-SO_4^{4-} -Lösung von 4°C betrug -48 mV . Es stieg nach dem Badwechsel auf -98 mV an. Bei diesem Experiment nehmen parallel zueinander Na^{+} -Transport und Membranpotential zu. Wenn der naheliegende Schluß zutrifft, der Natriumtransport erzeuge direkt die Potentialzunahme, dann muß es sich hier im Unterschied zur Membran des Riesenaxon um eine elektrogene Ionenpumpe handeln.

BONTING et al. (1962) zeigten, daß g-Strophantin (Ouabain) ein spezifischer Hemmer des aktiven Ionentransportes ist. Deshalb kann mit diesem Hemmer experimentell zwischen elektroneutralem und elektrogenem Transport unterschieden werden. Bei Vorliegen einer elektroneutralen Pumpe kann Ouabain das Membranpotential nicht beeinträchtigen. Dagegen muß Ouabain das Membranpotential senken, wenn es ganz oder teilweise auf dem Netto- Na^{+} -Efflux einer elektrogenen Ionenpumpe beruhen würde.

CASTEELS (1966) stellte fest, daß Ouabain an der Taenia coli des Meerschweinchens den intrazellulären Natriumgehalt erhöht. Dabei sinkt das Membranpotential und die Aktionspotentialfrequenz nimmt erwartungsgemäß zu. Die durch Änderung der Ionenkonzentration im Intra-zellulärraum verschobenen Gleichgewichtspoten-

tiale reichten nicht aus, um das geminderte Membranpotential zu erklären. Entfernung des Ouabain bewirkte eine plötzliche und starke Hyperpolarisation.

Eine mögliche Erklärung dieser Vorgänge bietet die Annahme einer glycosid-empfindlichen elektrogenen Natrium-Kalium-Pumpe. Durch Ouabain-Zugabe wird der aktive Natrium-Kalium-Transport gehemmt. Dann nehmen intrazelluläre $[Na^+]$ zu und intrazelluläre $[K^+]$ ab. Die Zellmembran depolarisiert. Nach Entfernung des Ouabain versucht die wieder freigegebene Ionenpumpe die normalen Ionenkonzentrationen wiederherzustellen und bewirkt dabei die beobachtete Hyperpolarisation, die das Gleichgewichtspotential übertrifft.

Diese Deutung führte zu der Frage nach der Temperaturempfindlichkeit des Potentials an Membranen mit elektrogener Ionenpumpe. Die Temperaturempfindlichkeit des aktiven Ionen-transportes ist von TUTTLE et al. (1962), EDWARDS und HARRIS (1957) und von KEYNES und SWAN (1959) untersucht worden. Am Skelettmuskel des Frosches wurde von STEINBACH (1954) im Temperaturbereich zwischen $4^{\circ}C$ und $22^{\circ}C$ für Na^+-K^+ -Transport der Q_{10} 3 gemessen.

Daraus ist zu erwarten, daß die Temperaturempfindlichkeit des Membranpotentials sich aus der Empfindlichkeit der am Membranpotential beteiligten Prozesse zusammensetzt. Das Diffusionspotential im elektrochemischen Gleich-

gewicht kann als "passiver" Prozeß nur wenig von der Temperatur abhängen. Dagegen ist eine stärkere Thermosensibilität des Anteils des Membranpotentials zu erwarten, der durch die elektrogene Ionenpumpe verursacht wird. Infolgedessen kann das Membranpotential, das in Gegenwart von Ouabain noch gemessen wird, nur wenig temperaturempfindlich sein. Dagegen ist für den Membranpotentialanteil, der durch Ouabain unterdrückt wird, eine hohe Thermosensibilität zu erwarten. Sie sollte ebenso groß sein wie die des aktiven Ionentransportes, also einen Q_{10} von ca. 3 zeigen.

SCHATZMANN (1961) hat an isolierten Streifen der *Taenia coli* des Meerschweinchens gezeigt, daß Desoxycorticosteron (Cortexon) die Frequenz der spontanen Aktionspotentiale und in deren Folge die Kontraktionskraft mindert. Da er an der Niere und am Myometrium eine fördernde Wirkung des Cortexon auf den aktiven Natriumtransport gefunden hatte, glaubte er, daß auch an der glatten Muskulatur der *Taenia* eine elektrogene Natriumpumpe aktiviert wird. Daraus sollte eine Hyperpolarisierung resultieren, die er jedoch nicht mit der von ihm verwendeten Sucrose-gap-Methode nachweisen konnte.

Wir haben deshalb den Temperatureinfluß auf das Ruhemembranpotential von Taenienzellen in Nährlösung nach SCHATZMANN (1961), in Gegenwart von Desoxycorticosteron (Cortexon) (3×10^{-5} Mol/l) und unter der Einwirkung von $1,37 \times 10^{-6}$ Mol/l Ouabain, mit intrazellulärer Ableitetechnik

gemessen. Wir erwarteten, daß Cortexon wegen seiner aktivierenden Wirkung auf eine elektrogene Natrium-Kalium-Pumpe die Membran hyperpolarisiert und daß dieser Effekt eine hohe Temperaturempfindlichkeit besitzt. Dagegen müßte die Thermosensibilität des Ruhemembranpotentials in Gegenwart von Ouabain nicht größer sein, als dem Temperatureinfluß auf das Diffusionspotential entspricht.

II. Methodik

Zur Gewinnung der *Taenia coli* eröffnete man das Abdomen und legte das Caecum frei. Die *Taenia coli* wurde ein Stück isoliert und mit Seidenfaden angeschlungen. Dann ließen sich beide Muskelschichten leicht abheben und stumpf von den darunterliegenden Geweben abpräparieren. In die entstandene Höhlung wurde ein Plexiglasplättchen von 6 mm Durchmesser unter die Muskelschichten geschoben. Dieses hatte eine Rinne an der Plättchenumrandung. Das über das Plättchen geschobene Gewebe fixierten wir durch einen Seidenfaden an der Rinne. An der einen Plättchen-seite beließen wir einen ca. 1 cm langen Taenienstreifen. Er diente zur simultanen Messung der isometrischen Kontraktionskraft. Durch die Zirkulärligatur war der Streifen von dem auf der Plättchenoberfläche liegenden Gewebe funktionell getrennt. Über eine Verbindung mit einem induktiven Druckaufnehmer wurde mit dem freien Taenienende die fast isometrische Spannungsentwicklung auf Direktschreiber aufgezeichnet.

Das Plexiglasplättchen mit der Muskulatur spannten wir in ein Badegefäß, das einen kontinuierlichen Lösungsfluß und ausreichende Umspülung der Muskulatur mit Nährflüssigkeit sicherstellte.

Die Nährlösung nach SCHATZMANN (1961) hatte folgende Zusammensetzung:

(mÄq/l) Na^+ : 148,7; K^+ : 4,7; Ca^{++} : 3,8;
 Mg^{++} : 2,34; Cl^- : 145,5; H_2PO_4^- : 2,3;
 HCO_3^- : 14,89; SO_4^{--} : 2,34 und 7 mMol/l Glukose.

Die Lösung war mit einem Gasgemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 gesättigt. Der pH der Lösung betrug 7,2 - 7,3.

g-Strophanthin (Ouabain) kristallin, reinst, wandten wir in einer Konzentration von $1,37 \times 10^{-6}$ M/l an.

Desoxycorticosteron (DOC) wurde als 21-Hydroxy-pregnen- ($\Delta 4$)-dion (3,20) in einer Konzentration von 3×10^{-5} M/l in alkoholischer Lösung zur Bade Flüssigkeit gegeben. Die Alkoholendkonzentration betrug 0,025 %. Kontrollversuche ergaben, daß diese Alkoholkonzentration ohne Einfluß auf die elektrische und mechanische Aktivität der *Taenia coli* blieb. Bei SCHATZMANN (1961) zeigte sogar die doppelte Konzentration keinen Einfluß auf die Muskulatur.

Die Temperatur registrierten wir kontinuierlich mit Thermoelement nahe der Gewebeoberfläche am Plättchen und zeichneten sie über Direktschreiber auf. Die elektrische Aktivität wurde mit Mikroelektroden aus Pyrexglas, mit Innendurchmesser an der Spitze kleiner als 0,2 μm , gemessen. Ihre Widerstände lagen zwischen 30 - 70 M Ω . Die Potentiale leiteten wir über eine Kathodenfolgerstufe mit Kapazitätsausgleich über einen Eingangswiderstand von 10^{12} M Ω einem Oszillographen mit Differentialverstärker zu. Die Eingangszeitkonstante betrug 2,5 μsec .

Dem Oszillographen war ein Großbildsichtgerät und ein Direktschreiber nachgeschaltet. Ein Ampex FR 1300 Magnetbandgerät speicherte neben der Zeitmarkierung die elektrischen Signale eines Versuches.

Aus dem Direktschreiberprotokoll wurden interessierende Signale herausgesucht. Wir riefen sie vom Magnetband ab und filmten über Oszillographen mit vorgeschalteter Kamera. Die gefilmten Signale wurden optisch vergrößert und graphisch ausgewertet. Zur Auswertung in den verschiedenen Experimentalreihen zogen wir für jede Temperaturstufe ein Taenienpräparat heran. Es wurden 5 - 20 Einstiche in verschiedene Zellen des jeweiligen Präparates vorgenommen. Die dabei registrierten Membranpotentiale mittelten wir arithmetisch. Als Membranpotential definierten wir den Mittelwert der größten Polarisationen zwischen 10 - 15 aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen. Dieses bezeichneten wir als "Membranruhepotential" (MRP). Zur Auswertung gelangten nur Werte, die von Einstichen stammten, bei denen die Spitzen der Aktionspotentiale wenigstens die isoelektrische Linie erreichten und bei denen die isoelektrische Linie vor und nach einem Einstich gleich hoch blieb.

III. Ergebnisse

a) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli*

Das MRP der *Taenia coli* sinkt mit abnehmender Temperatur von -45 mV bei 40° C auf -35,7 mV bei 28° C. Die Regressionsgerade der in Tab.1 aufgeführten Meßwerte ist durch $y = - 0,808 x + 14,33$ gekennzeichnet. Bei 28° C, 34° C und 40° C wurden die Meßergebnisse aus je zwei verschiedenen Präparaten verschiedener Tiere gewonnen und deshalb getrennt aufgeführt. Die Streuung der ermittelten Werte ist durch den Einfluß der Dehnung auf das Membranpotential erklärbar. Denn die Präparate werden während der Fixierung auf dem Plättchen unterschiedlich stark mechanisch beansprucht. BÜLBRING (1955) hat gezeigt, daß das Membranpotential der *Taenia coli* mit zunehmender Dehnung der Muskelzellen abnimmt.

Die Abb.1 zeigt die in der Tab.1 aufgeführten Meßwerte. Das MRP nimmt um 0,808 mV bei Temperaturanstieg um 1° C ab. Im Bereich zwischen 30° C und 40° C folgt rechnerisch ein $Q_{10} = 1,13$. Bei freier Diffusion würde er 1,03 betragen. Infolgedessen kann vermutet werden, daß am Zustandekommen des Membranpotentials ein thermosensibler Prozeß beteiligt ist.

Tabelle 1

Temperatureinfluß auf das Membranpotential der
Taenia coli in Normallösung

Präp. Nr.	Temperatur (C°)	Mittelwert (mV)	Standard- abweichung	Anzahl der Messungen
1a	28,0	36,500	± 1,702	40
1b	28,0	35,679	± 3,490	53
2	30,0	39,300	± 1,486	35
3	31,8	37,934	± 3,603	99
4	32,0	35,367	± 4,376	132
5a	34,0	42,860	± 5,434	50
5b	34,0	50,654	± 4,109	85
6	35,5	46,303	± 3,114	150
7	36,0	43,960	± 2,602	50
8	36,3	43,898	± 2,180	59
9	37,0	41,558	± 2,153	60
10	39,0	47,800	± 2,473	60
11a	40,0	44,988	± 2,299	45
11b	40,0	43,365	± 3,161	67

Die Werte jeder Zeile sind von je einem Taenien-
Präparat gewonnen

Regressionsgerade : $y = - 0,808 x + 14,328$

Korrelationskoeffizient : $(r) = 0,699$ ($n = 14$)

Signifikanz : $P = 0,01 - 0,001$

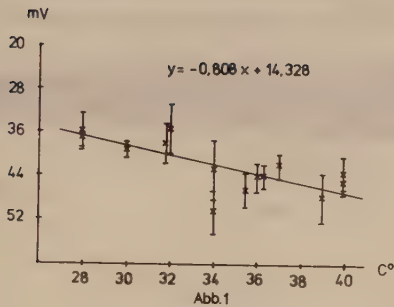


Abb.1: Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli* in Normallösung

b) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli* in Gegenwart von Ouabain

Die Zugabe von $1,37 \mu\text{M}$ Ouabain löst nach einer Latenzzeit von ca. 2 1/2 Minuten ein langsames Absinken des Membranpotentials aus. Es strebt einem tiefer liegenden, neuen Gleichgewichtswert zu. Die zeitliche Dichte der spontan abgefeuerten Aktionspotentiale nimmt mit abnehmendem Membranpotential zu (Abb.2). CASTEELS (1966) beschrieb erstmals diesen Glycosideffekt.

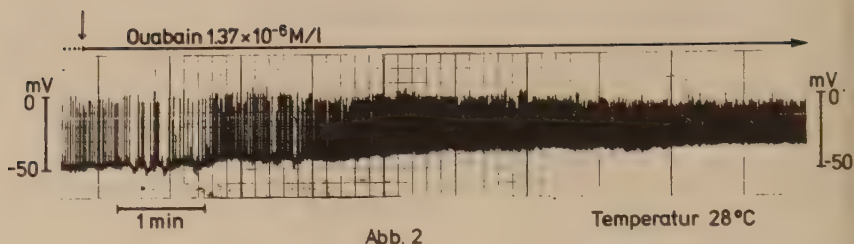


Abb. 2

Abb.2: Einfluß von Ouabain $1,37 \times 10^{-6}$ M/l
auf die elektrische Aktivität der
Taenia coli

Es erhebt sich die Frage, ob das durch Ouabain herbeigeführte tiefere MP ebenfalls temperatur-empfindlich ist.

In der Tab.2 sind die mittleren MP-Werte bei 4 Temperaturstufen mit ihren Standardabweichungen in Gegenwart von Ouabain aufgeführt. Die aus diesen Werten ermittelte Regressionsgerade (MP als Funktion der Temperatur) ist $y = -0,181 x + 36,61$. Der aus den Wertepaaren gewonnene Korrelationskoeffizient ist $-0,419$ mit $P \gg 0,1$. Hieraus folgt, daß die Regressionsgerade keine von 0 verschiedene Steigung hat. Infolgedessen ist die Temperaturabhängigkeit des MP in Ouabaingegenwart in dem Bereich zwischen 28°C und 40°C durch die Funktion $f(T) = \bar{y} \pm s_{\bar{y}}$ gekennzeichnet. Dabei ist $\bar{y}$ das mittlere Membranpotential aus

allen Messungen unter Ouabain, $s_{\bar{y}}$ ist die zugehörige Standardabweichung. Es ist dann $f(T) = 30,46 \pm 2,24$. Diese Bezeichnung ist in Abb.3 dargestellt.

Tabelle 2

Temperatureinfluß auf das Membranpotential der
Taenia coli in Gegenwart von Ouabain ($1,37 \times 10^{-6}$ M/l)

Präp. Nr.	Temperatur (C°)	Mittelwert (mV)	Standard- abweichung	Anzahl der Messungen
1a	28,0	31,977	$\pm 2,578$	111
3	31,8	28,900	$\pm 3,223$	100
7	36,0	32,750	$\pm 4,793$	80
11a	40,0	28,200	$\pm 4,316$	50

Regressionsgerade : $y = - 0,181 x + 36,61$

Korrelationskoeffizient : $(r) = - 0,419$

Signifikanz : $P \gg 0,1$

$f(T) = 30,46 \pm 2,24$

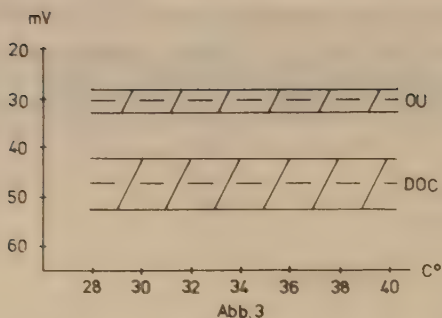


Abb. 3

Abb. 3: Mittlere Membranpotentiale der *Taenia coli* unter Ouabain (OU) und Desoxycorticosteron (DOC) bei verschiedenen Temperaturen

c) Der Temperatureinfluß auf das Membranpotential der *Taenia coli* in Gegenwart von Desoxycorticosteron

Die in Gegenwart von DOC ($30 \mu\text{M/l}$) im Temperaturbereich von 28°C bis 40°C gemessenen MP sind in der Tab. 3 wiedergegeben. Die daraus gewonnene Regressionsgerade (MP als Funktion der Temperatur) ist $y = - 0,183 x + 53,94$. Der aus den Wertepaaren gewonnene Korrelationskoeffizient ist $- 0,133$ mit $P \gg 0,1$. Ebenso wie in Ouabaingegenwart ist auch die Steigerung dieser Regressionsgeraden nicht von 0 verschieden. Analog zu dem Temperaturverhalten des MP unter Einfluß von Ouabain folgt daraus für DOC : $f(T) = 47,59 \pm 5,24$ (Abb. 3).

Nach dem t-Test unterscheiden sich die beiden Funktionen für die Temperaturabhängigkeit in Ouabain- und DOC-Gegenwart signifikant

: $\chi^2 = 429$, $t = 11$, daraus folgt $P < 0,001$.

Aus dem Vergleich der Varianzen

$(s_{\bar{y}})^2_{OU}$ und $(s_{\bar{y}})^2_{DOC}$ ergibt der F-Test für diese Varianzen einen signifikanten Unterschied

: $Q = 5,4$ ($P < 0,001$). Die signifikant verschiedene Streubreite der Einzelmessungen in Ouabain einerseits und DOC-Gegenwart andererseits deutet auf unterschiedliche Membranzustände.

Die DOC-Wirkung auf das MP bei verschiedenen Temperaturen wird in der Tab.4 dargestellt. Es ist die Differenz zwischen dem MP in DOC-Gegenwart und in Normallösung im Bereich von 28°C bis 40°C angegeben. Jede Differenz ist aus Mittelwerten gebildet, die jeweils einem Präparat entstammen. Die interindividuellen Unterschiede der Membranpotentiale werden deshalb weitgehend eliminiert. Die Auswahl der Einzelmessungen, aus denen die Mittelwerte gewonnen wurden, können der Tab.1 und Tab.3 entnommen werden.

In der Tab.4 sind diese MP-Differenzen als Funktion der Temperatur dargestellt. Die Korrelation der Differenzen mit der Temperatur ergibt bei Annahme einer linearen Beziehung zwischen beiden Größen einen Korrelationskoeffizienten von $\gamma = -0,918$ ($p < 0,001$). Diese Korrelation ist strenger als bei Annahme einer exponentiellen Abhängigkeit ($\gamma = -0,7232$; $p \ 0,05 - 0,01$). Bei 28°C wird das MP durch Zugabe von DOC um $12,52 \text{ mV}$ vergrößert. Bei 40°C ist dagegen keine Differenz feststellbar.

Tabelle 3

Temperatureinfluß auf das Membranpotential der
Taenia coli in Gegenwart von Desoxycorticosteron
(30 μ M/l)

Präp. Nr.	Temperatur (°C)	Mittelwert (mV)	Standard- abweichung	Anzahl der Messungen
1b	28,0	48,200	$\pm$ 10,008	50
2	30,0	49,333	$\pm$ 5,393	60
4	32,0	40,925	$\pm$ 3,001	40
5a	34,0	46,475	$\pm$ 1,165	40
5b	34,0	58,460	$\pm$ 1,991	75
6	35,5	50,966	$\pm$ 2,167	45
8	36,3	46,088	$\pm$ 1,177	40
9	37,0	41,370	$\pm$ 1,640	50
10	39,0	50,750	$\pm$ 5,948	60
11b	40,0	43,370	$\pm$ 1,781	60

Regressionsgerade : $y = - 0,183 x + 53,94$

Korrelationskoeffizient : $(r) = - 0,133$

Signifikanz : $P \gg 0,1$

$f(T) = 47,59 \pm 5,24$

Tabelle 4

Temperaturabhängigkeit der DOC-Wirkung auf das
Membranpotential der Taenia coli

Präp. Nr.	Temperatur (°C)	Membranpotential- differenz ($MP_{DOC} - MP_{Norm}$)
1b	28,0	12,521 mV
2	30,0	10,033 mV
4	32,0	5,558 mV
5a	34,0	3,615 mV
6	35,5	4,663 mV
8	36,3	2,190 mV
9	37,0	- 0,188 mV
10	39,0	2,950 mV
11b	40,0	0,005 mV

Korrelationskoeffizient : $(r) = - 0,918$

Signifikanz : $P < 0,001$

IV. Diskussion

Von den Nernst'schen quantitativen Beschreibungen elektrischer Potentiale ausgehend, die zwischen zwei Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen einer bestimmten Ionenart bestehen, stellte BERNSTEIN bereits 1912 die im Prinzip heute noch gültige Theorie für die Erklärung des Membranpotentials auf. Sie geht von der Annahme aus, daß die ruhende Zellmembran nur für K^+ permeabel sei; während der Erregung würde sie auch für Na^+ und Cl^- penetrierbar werden. Diese Vorstellungen mußten erweitert werden, als HODGKIN und HUXLEY (1939, 1945) fanden, daß während der Aktionspotentiale (AP) das negative MRP positiv wird (overshoot).

Weiter stellte sich heraus, daß die ruhende Membran nicht nur permeabel für Kalium-Ionen ist, sondern ebenso für Chloridionen (BOYLE, CONWAY 1941) und in geringem Maße auch für Natriumionen (LEVI, USSING 1948; KEYNES 1954). Das bedeutet, daß Natriumionen aus dem Extrazellulärraum unter Einfluß von Konzentrationsgradienten und Membranpotential in die Zelle diffundieren müssen. Den ständigen Leckstrom von Na^+ und K^+ durch die Membran muß ein gegensinnig gerichteter aktiver Transport kompensieren, um die Konzentrationsgradienten im "steady state" zu halten.

Ein solches Transportsystem wurde zuerst von HODGKIN und KEYNES (1955) am Riesennerven des Tintenfisches untersucht. Es existiert auch in anderen

Nervenfasern, in Skelettmuskeln und in der glatten Muskelzelle (CASTEELS 1971).

Es erhebt sich die Frage, ob durch diesen Transport positiver Ladungsträger das Membranpotential beeinflusst wird.

Ein System, in dem Natrium-Auswärts- und K^+ -Einwärtsstrom sich wie 1:1 verhalten, bringt an der Membran keine Ladungsstörung zustande. Diese Ionenpumpe arbeitet also elektroneutral.

Ein anderes System ist denkbar, in dem nur Na^+ aus der Zelle transportiert werden, die K^+ und Cl^- aber sich nach dem Gibbs-Donnan-Gleichgewicht entsprechend auf den Intra- und Extrazellulärraum verteilen. Dies ist das Modell einer nicht gekoppelten elektrogenen Na^+ -Ionenpumpe.

Bei einer Koppelung des Na^+ - Auswärts- an den K^+ -Einwärtsstrom resultiert ein Potential, wenn der Netto-Efflux des Na^+ größer ist als der K^+ -Influx. Dieses Modell wird als gekoppelte elektrogene Na^+ - K^+ -Ionenpumpe bezeichnet.

POST (1968) stellte fest, daß die Ionenpumpe tierischer Zellmembranen stöchiometrisch auf drei Natriumionen nach außen, zwei Kaliumionen nach innen transportiert.

POST et al. (1969) haben in der durch Ultraschall gewonnenen Membranfraktion eine Mg^{++} , K^+ und Na^+ aktivierbare Adenosintriphosphatase nachgewiesen. In Gegenwart von Natrium

phosphoryliert ATP das Enzym. Kalium dephosphoryliert diese Zwischenstufe. Die Autoren sehen in diesem System einen Ionencarrier, dessen Energiebedarf aus seiner Phosphorylierung gespeist wird und der eine Na^+ - K^+ -reziproke Kinetik zeigt.

BONTING et al. (1962) gelang es, dieses spezifische Enzym in allen 21 untersuchten Na^+ -transportierenden Gewebetypen 10 verschiedener Tierarten nachzuweisen; unter anderem in den Herzmuskeln vom Frosch, Hund, Kaninchen, Meer-schweinchen; in den Nieren vom Hund und Kaninchen; im Riesenaxon vom Tintenfisch; in Froschhaut und in glatter Muskulatur des Kaninchenuterus. Sie isolierten die ATP-ase aus den Membranen dieser Gewebe und wiesen ihre Glycosidempfindlichkeit nach. In 8 von 12 Geweben, in denen eine glycosidempfindliche Kationaustauschrate errechnet wurde, konnten BONTING et al. (1962) einen qualitativen Zusammenhang zwischen Kationaustauschrate und Na^+ - K^+ -ATPase-Aktivität nachweisen.

AUDITORE und MURRAY (1962) isolierten die ATPase aus Kaninchenventrikel, SKOU (1960) aus Nervenmembranen. Beide finden, daß zur Bildung eines Enzymsubstratkomplexes Mg^{++} erforderlich ist. Na^+ und K^+ werden an zwei verschiedenen Orten dieses Komplexes angelagert. Na^+ bzw. K^+ allein aktiviert nur sehr gering. Gemeinsame Zugabe von Na^+ und K^+ jedoch hatte eine intensive Aktivierung zur Folge mit einem Maximum bei $\text{Na} : \text{K}$ von etwa 10 : 1. Ouabain hemmt den aktivierenden Effekt durch Na^+ und K^+ .

Diese Untersuchungen stützen den Befund von POST et al. (1969) und machen einen gekoppelten elektrogenen Transport von Ionen an den untersuchten Membranen wahrscheinlich.

Da ein ATPase-abhängiger Transportmechanismus vorliegt, ist zu erwarten, daß sowohl die sog. "Transport-ATPase" als auch der Netto-Ionen-transport typische Temperaturabhängigkeit zeigen. Durch Temperatursenkung werden aktiver Na-K-Ionentransport (EDWARDS, HARRIS 1957) und Transport-ATPase gehemmt. Der Q_{10} beträgt zwischen 4° und 22° über 3 für den Ionentransport des Froschmuskels (STEINBACH 1954) und liegt zwischen 20° und 37° C bei 4 - 2 für die Transport-ATPase des Meerschweinchenherzens (REPKE, PORTIUS 1963).

Aus diesen Befunden ist zu erwarten, daß der Teil des MRP, der von der Abhängigkeit einer elektrogenen Ionenpumpe abhängt, eine ähnliche Temperaturempfindlichkeit zeigt, wie die zugehörige Transport-ATPase.

Da nach AUDITORE und MURRAY (1962) und SKOU (1960) Ouabain den aktivierenden Effekt von Na^{+} und K^{+} auf den Enzymsubstratkomplex verhindert und nach BONTING et al. (1962) eine glycosid-empfindliche Kationenaustauschrates in qualitativem Zusammenhang mit glycosidempfindlicher ATPasen-Aktivität nachgewiesen wurde, müßte Ouabain in geeigneter Konzentration den Anteil des elektrogenen Transportes am Membranpotential ausschalten. Dies führt zu einer Depolarisation bis zu dem Wert des MP, der durch die passive Komponente verursacht wird. Dieses verbleibende Membranpotential kann nur die Temperaturabhängigkeit der Diffusionsprozesse

zeigen, d.h. der Q_{10} müßte nahe 1 liegen.

Die Abb.3 zeigt, daß erwartungsgemäß unter Ouabain das Membranpotential im Bereich von 28° bis 40° C gleichbleibend bei $-30,46 \pm 2,24$ mV liegt. Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten von REPKE (1963). Er konnte am Herzmuskel des Meerschweinchens zeigen, daß Ouabain die Transportaktivität der ATPase hemmt und daß die Hemmwirkung mit sinkender Temperatur abnimmt. Das von uns gemessene Membranpotential von etwa 30 mV kann also als das MP angesehen werden, das dem passiven Diffusionspotential entspricht.

Aus dieser Überlegung folgt, daß am MRP von ca. -45 mV, das bei 40° C gemessen wurde (Tab.1), die elektrogene Ionenpumpe einen Potentialzuwachs von -30 mV auf -45 mV verursacht. In diesem Potentialbereich muß eine Temperaturempfindlichkeit vorliegen, die der enzymatischen Prozesse entspricht, die in Verbindung mit dem Carriersystem gefunden wurden. Nach den Regressionsgeraden der Temperaturabhängigkeit des MRP ($y = -0,808 x + 14,328$) und der Temperaturabhängigkeit des MP in Gegenwart von $1,37 \mu\text{Mol/l}$ Ouabain ($y = -30,46 \pm 2,24$) errechnet sich im Bereich von 30° bis 40° C ein Q_{10} von ca. 2,0. Er liegt an der unteren Grenze der von REPKE und PORTIUS (1963) mitgeteilten Werte der Transport-ATPase des Meerschweinchenherzens von 2 - 4.

Auch CASTEELS (1969) kommt zu dem Schluß, daß an der Taenienzelle eine elektrogene Ionenpumpe das aktuelle MRP über das Diffusionspotential hebt. Dieses Diffusionspotential errechnete er mit

Hilfe der GOLDMAN-Gleichung (1943). Die Permeabilitätskonstanten und die intrazellulären Ionenkonzentrationen gewann er aus Fluxmessungen. Dabei kommt er auf ein MRP von - 37 mV. Die Diskrepanz zwischen dem errechneten und dem von HOLMAN (1958) mit ca. - 51 mV gemessenen Wert erklärt er mit der Wirkung der elektrogenen Pumpe.

Der Unterschied zwischen dem von uns mit - 30 mV gemessenen und dem von CASTEELS (1969) errechneten Wert kann durch den Unterschied in der verwendeten Nährlösung erklärt werden. CASTEELS verwendete die von KREBS (1950) angegebene Lösung, wir dagegen die von SCHATZMANN (1961) empfohlene. Wir beobachteten stets, daß bei Anwendung der Schatzmann-Lösung die gemessenen MRP um 5 mV geringer waren, als wenn die Krebs-Lösung benutzt wurde.

Während durch Ouabain der Anteil des elektrogenen Transportes am Membranpotential ausgeschaltet werden kann, so daß nur die passiven Prozesse einen Einfluß auf das Membranpotential behalten und somit die Temperaturabhängigkeit nicht mehr besteht, müßte umgekehrt durch Substanzen, die die Aktivität der ATPase stimulieren, eine Vergrößerung des elektrogenen Anteils am Membranpotential und damit eine Verstärkung der Temperaturabhängigkeit erreicht werden.

SCHATZMANN (1961) stellte fest, daß Steroide, darunter DOC, die an der Niere und am Myometrium einen fördernden Einfluß auf den aktiven Natriumtransport haben, an der Taenia coli eine Minderung

der Aktionspotentialfrequenz und deshalb auch einen Tonusabfall bewirken. Auf Grund der von BÜLBRING (1955) aufgestellten Regel über den Zusammenhang zwischen Aktionspotentialfrequenz, Tonus und Membranpotential könnte erwartet werden, daß die Membran hyperpolarisiert wird. In der Tab. 4 sind die Hyperpolarisierungen durch DOC wiedergegeben. Ihr Betrag nimmt mit fallender Temperatur zu. Bei 28°C beträgt der DOC-Effekt auf das MP 12,5 mV Zuwachs, bei 40°C dagegen 0. Eine Erklärung für dieses überraschende Phänomen kann im Bereich der Energie liefernden Prozesse gesucht werden, von denen die Wirkung der elektrogenen Pumpe auf das MP abhängt.

DOC hat nach LANDON (1966) eine aktivierende Wirkung auf die ATPase, die in Membranpräparaten der Affenniere gemessen wurde. Die Präparate wurden aus adrenaletomierten Tieren gewonnen.

CONWAY et al. (1961) beschrieben für den Skelettmuskel eine "Energie-Barriere" für die aktiven Transportvorgänge. Es wurde festgestellt, daß der Na^{+} -Efflux aus Na^{+} -angereicherten Muskeln gehemmt wird durch eine elektrische Komponente und auch durch Ionenkonzentrationsgradienten. Zu hohe Konzentrationsgradienten oder/und zu hohes Membranpotential kann nach CONWAY die Ionenpumpe nicht überwinden, weil die dazu erforderlichen Energiebeträge nicht bereitgestellt werden können. Die Pumpleistung stagniert bei Erreichen der nicht mehr überwindbaren Gradienten.

Nach unseren Ergebnissen müßte bei 40°C der elektrische Gradient zu steil für die Leistungs-

fähigkeit der DOC-aktivierten elektrogenen Pumpe sein. Die Ionenkonzentrationen wurden während unserer Experimente nicht verändert, so daß hier keine Ursache für Limitierung der Pumpleistung zu suchen ist. Durch Temperaturerniedrigung wird das Membranpotential vermindert. Deshalb kann die Ionenpumpe, durch DOC aktiviert, um so stärker zur Wirkung kommen, je größer die MP-Minderung ist. Ihr Effekt kann nur bis zu dem unüberwindbaren elektrischen Gradienten reichen. Er scheint in unseren Experimenten bei einem MP von - 45 mV zu liegen. Wenn die von CONWAY inaugurierte Energiebarriere erreicht ist, kann durch Senkung der externen Natriumkonzentration oder durch Erhöhung der externen Kaliumkonzentration die Energiebarriere zu höheren MP verschoben werden. Nur unter diesen Bedingungen wäre auch bei 40° C eine DOC-Wirkung auf das Membranpotential zu erwarten.

Wir nehmen an, daß DOC über eine Stimulierung aktiver Transportprozesse wirkt, daß dieser Stimulierung aber energetische Grenzen gesetzt sind. Zur weiteren Klärung dieser DOC-Wirkung können solche elektrophysiologischen Untersuchungen Aufklärung erwarten lassen, bei denen die Temperaturabhängigkeit der DOC-Effekte bei Minderung der Konzentrationsgradienten für Na^+ oder/und K^+ an der Taenienzellmembran gemessen werden.

V. Literaturverzeichnis

AUDITORE, J.H.; Murray, L.

Cardiac (microsomal) Na + K Adenosin-
triphosphatase and its possible
relationship to the active Na + K
transport system
Arch. Biochem. 99, 372 - 382 (1962)

BONTING, S.L.; Carravaggio, L.L.; Hawkins, N.M.

Studies on sodium-potassium-activated
adenosintriphosphatase. IV. Correlation
with cation transport sensitive to
cardiac glycosides
Arch. Biochem. 98, 413 - 419 (1962)

BOYLE, P.J.; Conway, E.J.

Potassium accumulation in muscle and
associated changes
J. Physiol. 100, 1 - 63 (1941)

BÜLBRING, E.

Correlation between membrane potential,
spike discharge and tension in smooth
muscle
J. Physiol. 128, 200 - 221 (1955)

CASTEELS, R.

The action of Ouabain on the smooth muscle
cells of the guinea-pig's taenia coli
J. Physiol. 184, 131 - 142 (1966)

CASTEELS, R.

Calculation of the membrane potential
in smooth muscle cells of the guinea-
pig's taenia coli by the Goldman-Equation
J. Physiol. 205, 193 - 208 (1969)

CASTEELS, R.; Droogmans, G.; Hendrickx, H.

Membrane Potential of smooth muscle cells
in K-free solution
J. Physiol. 217, 281 - 295 (1971)

CASTEELS, R.; Droogmans, G.; Hendrickx, H.

Electrogenic Sodium Pump in smooth muscle
cells of the guinea Pig taenia coli
J. Physiol. 217, 297 - 313 (1971)

CONWAY, E.J.; Kernan, R.P.; Zadunaisky, J.A.

The sodium pump in skeleted muscle in
relation to energy barriers
J. Physiol. 155, 263 - 279 (1961)

EDWARDS, C.; Harries, E.J.

Factors influencing the sodium movement
in frog muscle with a discussion of the
mechanism of sodium movement
J. Physiol. 135, 567 - 580 (1957)

GOLDMAN, D.E.

Potential, impedance and rectification
in membranes
J. gen. Physiol. 27, 37 - 60 (1943)

HODGKIN, A.L.

The relation between contraction velocity
and the electrical resistance outside
a nerve fibre
J. Physiol. 94, 560 - 570 (1939)

HODGKIN, A.L.; Huxley, A.F.

Resting and action potentials in
single nerve fibres
J. Physiol. 104, 176 - 195 (1945)

HODGKIN, A.L.; Keynes, R.D.

Active transport of cations in giant
axons from Sepia and Loligo
J. Physiol. 128, 28 - 60 (1955)

HOLMAN, M.E.

Membrane potentials recorded with high-
resistance micro-electrodes and the
effect of changes in ionic environment
on the electrical and mechanical activity
of the smooth muscle of the taenia coli
of the guinea pig
J. Physiol. 141, 464 - 488 (1958)

KEYNES, R.D.

The ionic fluxes in frog muscle
Proc. R. Soc. B. 142, 359 - 382 (1954)

LONDON, E.J.; Jazab, N.; Forte, L.

Aldosterone and sodium-potassium-dependent
ATPase activity of rat kidney membranes
Am. J. Physiol. 211, 1050 - 1056 (1966)

LEVI, A.; Ussing, H.H.

The exchange of sodium and chloride ions
across the fibre membrane of the isolated
frog surtorius
Acta physiol. scand. 16, 232 - 249 (1948)

MULLINS, L.J.; Awad, M.Z.

The control of the membrane potential
of muscle fibres by the sodium pump
J. gen. Physiol. 48, 761 - 775 (1964)

POST, R.L.

The salt pump of animal cell membranes
B.B.A. Library 11, 163 - 169 (1968)

POST, R.L.; Kume, S.; Tobin, T., et al.

Flexibility of an active center in
sodium-plus-potassium Adenosintriphosphatase
J. gen. Physiol. 54, 306 s - 326 s (1969)

REPKE, K.; Portius, H.J.

Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase
in der Zellmembran des Herzmuskels
mit einem Digitalis Rezeptorsystem
Experientia 19, 452 - 458 (1963)

SCHATZMANN, H.J.

Die Wirkung einiger Steroidhormone und
von Hydroxydion auf den Tonus des glatten
Darmmuskels
Helv. Physiol. Acta 19, C 106 - 110 (1961)

SCHATZMANN, H.J.; Ackermann, H.

Die Strophantinwirkung am Darmmuskel und
ihre Beziehung zum Kationengehalt
des Mediums
Helv. Physiol. Acta 19, 196 - 213 (1961)

SKOU, J.Chr.

Further investigations on a Mg^{++} + Na^{+} -
activated adenosintriphosphatase,
possibly related to the active
linked transport of Na^{+} and K^{+} across
the nerve membrane
Biochem. Biophys. Acta 42, 6 - 23 (1960)

STEINBACH, H.B.

in Symposia of the Society for
Experimental Biology Nr. VIII
(Cambridge University Press, London 1954)
p. 438

TUTTLE, R.S.; Farah, A.

zit. in "Über die Identität der
Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran
des Herzens mit einem Digitalis-
Rezeptorsystem"
Experientia 19, 1963, p. 457

Herrn Prof. Dr. Ulbrecht danke ich für
die Überlassung des Themas und für
wohlwollende Unterstützung der Arbeit.

Den Herren Priv. Doz. Dr. Riemer und
Priv. Doz. Dr. Mayer danke ich für
wertvolle Ratschläge und Hilfen.

Für die vielfältige Unterstützung bei
den Versuchsvorbereitungen bedanke ich
mich herzlich bei Fräulein Reichert
und Fräulein Wolff.

Lebenslauf

Am 6. Juni 1946 wurde ich als erstes von den drei Kindern des Ingenieurs Gerhard Harms und seiner Ehefrau Gerda, geb. Tönjes in Oldenburg geboren.

Nach dem vierjährigen Besuch der Grundschule wurde ich 1956 am Hindenburg-Gymnasium aufgenommen. 1964 wechselte ich in den neusprachlichen Zweig des "Alten Gymnasium" Oldenburg. An dieser Schule legte ich am 28. Februar 1966 die Reifeprüfung ab.

Vom April 1966 bis März 1967 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundesmarine als Sanitätsoffizieranwärter ab.

Mit dem Sommersemester 1967 immatrikulierte ich mich in der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität zu München. Mit Datum vom 18. Juni 1973 legte ich an dieser Universität das Medizinische Staatsexamen mit der Note "Gut" ab.

Vom 1. Juli 1973 bis Juni 1975 erfolgte die Ableistung der Medizinalassistentenzeit am Bundeswehrkrankenhaus München. Die Approbation als Arzt wurde am 5. Juli 1974 erteilt.

Ab 1. Juli 1974 Truppenarzt beim Jagdbombergeschwader 32, Lechfeld; nach Ablegung der Prüfung im November 1974 dort bis Januar 1977 als Fliegerarzt tätig. Von Januar 1977 bis August 1977 Ausbildung am Max-Planck-Institut für Neurologie und Psychiatrie, Theoret. Institut. Seit August 1977 Tätigkeit im Flugmedizinischen Institut der Luftwaffe.

Heirat am 21. Mai 1969, ein Kind.

